

Н.М. Грегірчак, канд. техн. наук

Я.С. Косянчук

Gregyrchak N.,

Kosianchuk Y.

**ДОСЛІДЖЕННЯ БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ
НОВОСИНТЕЗОВАНИХ СПОЛУК**

**TREATISE BIOLOGICAL ACTIVITY OF NEW SYNTHESIZED
COMPOUNDS**

Пошук нових синтетичних протимікробних речовин базується переважно на скринінгу in vitro великих масивів хімічних сполук по відношенню до невеликої кількості потрібних видів біологічної активності і включає два етапи. Перший етап - комп'ютерний скринінг новосинтезованих органічних сполук системою PASS на визначення типу протимікробної дії. В ході проведення другого етапу роботи було досліджено 22 новосинтезовані органічні сполуки на антимікробну активність на тест-культурах, механізм дії яких полягає в дезорганізації структур мембран мікроорганізмів (Membrane integrity antagonist). Отримані дані дозволили визначити найбільш ефективні зразки щодо досліджених тест-культур та їх специфічність до вибраних тест-об'єктів.

Ключові слова: протимікробна дія, скринінг новосинтезованих органічних сполук, похідні хіноксаліну, комп'ютерна система PASS, дезорганізація структур мембран.

© Н.М. Грегірчак, Я.С. Косянчук

Researching of new synthetic antimicrobial substanses generally rests on screening in vitro big number chemical compounds in concerning of element indispensable kinds of biological activity and included two important stages. First of them was computer screening of new synthesized organic compounds by PASS system for definition antimicrobial activity. In the course of second stage of treatise 22 new synthesized organic compounds were checked on their antibiotic activity on microorganisms cell culture. Mechanism of these action proved in disorganize membranes structure(Membrane integrity antagonist). The evidence of our research made us possibility to determined the most effective organic compounds to the ample quantity and peculiaritied them to different groups of microorganisms.

Key words: *antimicrobial activity, screening of new synthesized organic compounds, derivation of , computer PASS system, membrane integrity antagonist.*

Формування організмами–збудниками інфекційних хвороб резистентності до антибактеріальних препаратів відноситься до провідних факторів, що обмежують ефективність цих лікарських препаратів в хіміотерапії бактеріальних інфекцій[4]. Тому необхідно весь час здійснювати пошук нових сполук, які б пригнічували ріст мікроорганізмів. Одним з цих напрямків є хімічний синтез нових органічних сполук, які б мали дані властивості[2].

Хімічно синтезовані препарати мають ряд переваг над природними антибіотичними речовинами:

а) виключається виникнення стійкості через перехресне переенсення генетичної інформації між мікроорганізмами (траспозони, плазміди).

б) оскільки речовини є синтетичними, вони можуть містити декілька функціональних груп, які тільки підсилюють антимікробні властивості отриманої субстанції.

в) клітині мікроорганізму значно важче виробити специфічні засоби захисту, такі, як модифікація структури антибіотичної речовини чи зміна власних структурних компонентів, що позбавить антибіотик мішені біологічної дії.

Пошук нових ефективних засобів протимікробної дії потребує проведення великого масиву роботи по скринінгу синтезованих речовин в умовах *in vitro*. Властивості знайдених таким шляхом базових структур потім оптимізуються шляхом синтезу та досліджень великої кількості їх аналогів. Такий підхід потребує значних затрат часу і капіталовкладень. Тому, особливий інтерес представляють спеціалізовані комп'ютерні програми, які забезпечені базою, яка аналізує очікувану біологічну дію за вже відомими хімічними структурами речовин[5]. До подібних програм відносять WHONET та PASS.

Можливість застосування PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances) для вирішення практичних завдань доведена численними експериментами[1]. Доступна її версія прогнозує 783 види біологічної активності за структурною формулою. Прогнозовані види активності підтверджені для речовин різних хімічних класів, що виявляють різноманітні ефекти: протибактеріальний, антиаритмічний, протипухлинний, гепатопротекторний, антиамнестичний, протизапальний, антиоксидантний та ін. Середня точність прогнозу при тестуванні складає 85%, що достатньо для практичного використання PASS з метою прогнозу спектра біологічної активності нових сполук, оскільки очікувана імовірність вгадування одного з 780 видів активності біля 0,1%. Результати прогнозу видаються у вигляді списку назв імовірних видів активності з розрахованими оцінками імовірності наявності (P_a) та відсутності кожного виду активності (P_i), що мають величини від 0 до 1. P_a і P_i є оцінками міри приналежності досліджуваної речовини до класів активних та неактивних сполук, та розраховуються незалежно за відповідними підвибірками тому їх сума не дорівнює 1. Оскільки метою дослідження є пошук речовин з достатньо високим рівнем новизни (New Chemical Entity, NCE), слід відбирати сполуки з прогнозованою імовірністю для потрібного виду активності дещо нижчу за P_a 0,5.

Співробітниками кафедри органічної хімії було синтезовано 9809 хімічних сполук. Новосинтезовані речовини ідентифікували за допомогою програми PASS та відібрали ті, які за прогнозом мали анитбактеріальну та протигрибкову активність. Аналіз одержаних даних за вибраними типами активності виявив позитивний результат за вказаним критерієм $P_a > 0,5$ по п'яти видах (2,3 Oxidosqualene lanosterol cyclase inhibitor, Anti-Helicobacter pylori, Antimycobacterial, Topoisomerase inhibitor та Membrane integrity antagonist) для 576 сполук.

Нас зацікавило вивчення новосинтезованих сполук з механізмом дії, який передбачає дезорганізацію мембранних структур (Membrane integrity antagonist) різних видів мікроорганізмів. В перелік речовин з вищезгаданими властивостями входить 55 синтетичних сполук, які мають 14 базових структур.

Відомо, що за складом мембрани бактеріальних клітин – ліпопротеїдні структури, в які включені молекули білка. Ліпіди, що утворюють бімолекулярний шар є структурною основою мембран. У мембранах мікроорганізмів найбільш широко представлені гліколіпіди. У бімолекулярний шар включені білки, набір яких визначає властивості й специфіку функціонування мембрани. Товщина мембрани становить 6-8 нм[3].

Мембрани виконують ряд функцій, основними з яких є наступні:

- а) реакція на зміни, що відбуваються у зовнішньому середовищі, і передача інформації всередину клітини;
- б) регуляція внутрішньоклітинного вмісту, зв'язана з активним викидом продуктів метаболізму або сторонніх речовин, що проникли через мембрану, а також нагромадженням у клітині субстратів метаболізму.

Перенос (транспорт) речовин через цитоплазматичну мембрану може здійснюватися трьома основними шляхами: пасивна дифузія, полегшена дифузія, енергозалежний транспорт.

Надходження антибіотиків у клітину мікроорганізмів – процес активного транспорту. Варто підкреслити, що на транспортні потреби бактеріальна клітина витрачає в середньому 20 – 30 % енергії, утвореної в процесі обміну речовин. Накопичення усередині клітин мікроорганізмів антибіотика – цього неметаболізуючого інгібітору – пояснюється тим, що антибіотики "користуються" транспортними системами, призначеними для переносу звичайних метаболітів,

"підмінюючи" останні. Така "підміна" можлива завдяки певній хімічній подібності антибіотиків і нормальних продуктів обміну.

Антибіотичні речовини, які діють на цитоплазматичну мембрану, можна розділити на три групи: речовини, що викликають дезорганізацію структури мембран, антибіотичні речовини - іонофори сполуки, які інгібують пов'язаний з мембраною білок (фермент), що приймає участь у процесах транспорту.

До речовин, що викликають дезорганізацію структури мембран входять граміцидин С, поліміксини, полієни.

Граміцидин С – антибіотик, що порушує організацію ліпопротеїдних систем і проникність клітин, створювану мембраною. Ступінь цих порушень залежить від концентрації антибіотика. Граміцидин повільно знижує поверхневий натяг. Він може вступати у зв'язок із клітинними мембранами. В основі механізму біологічної дії граміцидина С лежить порушення ним стану й функціонування мембран клітин у результаті зв'язування антибіотика з мембранними компонентами. Це викликає, з одного боку, зміну проникності мембран і швидку втрату клітинами життєво важливих з'єднань типу нуклеотидів, неорганічного фосфору, амінокислот, а з іншого боку – пригнічення процесу енергетичного обміну, особливо його початкової стадії – дегідрування. Граміцидин С інгібує активність ряду ферментів, локалізованих в мембрані.

Поліміксини – з'єднання, які зв'язуються з мембраною бактеріальної клітини й порушують її нормальну функцію. Під впливом антибіотиків цієї групи при відносно невисоких концентраціях відбувається вихід із клітин низькомолекулярних речовин (фосфору, пентоз) і розпад нуклеїнових кислот. Ці антибіотики володіють високою біологічною активністю у відношенні до грамнегативних бактерій.

Показано, що протопласти багатьох грампозитивних бактерій чутливі до дії поліміксинів.

Поки немає достовірних даних про точну мішень дії поліміксинів у клітинах чутливих до них мікроорганізмів. Встановлено, що рецепторами цих антибіотиків можуть бути фосфоліпіди, у результаті взаємодії з якими поліміксини викликають дезорганізацію структури мембран.

Поліміксини використовують як своєрідну систему для вивчення взаємодії антибіотик-мембрана *in vivo*.

Полієнові антибіотики (ністатин, рімоцидин, філіпін, ендоміцин, кандіцидин, трихоміцин) – біологічно активні з'єднання, здатні змінювати проникність клітин, чутливих до їхньої дії. Як відомо, проникність клітини залежить насамперед від цитоплазматичної мембрани.

Специфічна токсичність полієнових антибіотиків обумовлена їхньою взаємодією з одним з компонентів цитоплазматичної мембрани чутливих клітин, що належать до стеринів. У результаті міняється селективність проникності мембран, що приводить до виходу із клітини найважливіших метаболітів і порушенню здатності мембран контролювати засвоєння поживних речовин.

Всі полієнові антибіотики пригнічують розвиток еукаріотичних організмів (грибів, водоростей), що містять у своїх мембранах стерини. Полієни викликають лізис протопластів і еритроцитів .

Важливо відзначити, що досліджувані новосинтезовані речовини не можна віднести до антибіотиків, оскільки ми не проводили спеціальних досліджень. Ще складнішим є завдання точного визначення мішені в клітині мікроорганізму, що базувалося б не на комп'ютерному прогнозі, а на експериментальних даних. Тому, припущення щодо специфіки портимікробної дії новосинтезованих хімічних сполук ми робили, виходячи з літературних джерел на основі прогнозу системи PASS.

Нами для дослідження впливу новосинтезованих сполук різної хімічної природи на проникність мембрани були обрані з музею кафедри біотехнології мікробного синтезу такі культури бактерій: *Bacillus subtilis* (грампозитивна спороутворююча), *Staphylococcus aureus* (грампозитивна неспороутворююча), *Escherichia coli* (грамнегативна неспороутворююча); гриби: *Penicillium chrysogenum*, *Rhizopus nigricans*, *Fusarium*; дріжджі: *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*.

Дію протимікробних речовин визначали за зонами затримки росту мікроорганізмів та грибів дифузійним методом з використанням металевих циліндрів. Висів проводили на МПА, ГКА середовища.

Для визначення активності досліджуваних сполук за діаметрами зон затримки росту бактерій та грибів використовували їх розчини різної концентрації.

На поверхні поживного середовища в чашках Петрі розставляли металічні циліндрики (з зовнішнім діаметром 8мм, внутрішнім діаметром 6мм і висотою 10 мм) із алюмінію або нержавіючої сталі. В кожен циліндр вносили по 0,2 мл препарату. Через дві доби вирощування в термостаті при температурі 30 °С вимірювали діаметри зон затримки росту бактерій за допомогою лінійки. Через 3-5 доби вирощування в термостаті при температурі 26 – 28 °С вимірювали діаметри зон затримки росту грибів

Для визначення діаметрів зон затримки росту використовували сполуки з концентрацією $\leq 10^{-5}$ моль/л, оскільки саме за цієї розрахованої нами концентрації сполуки доцільно розглядати для у використання. Тобто, ми шукали таку речовину, яка б мала найвищу протимікробну активність до широкого спектру мікроорганізмів за мінімальних концентрацій.

Результати досліджень наведено у діаграмах, що показують дію синтезованих сполук на бактерії, гриби та дріжджі.

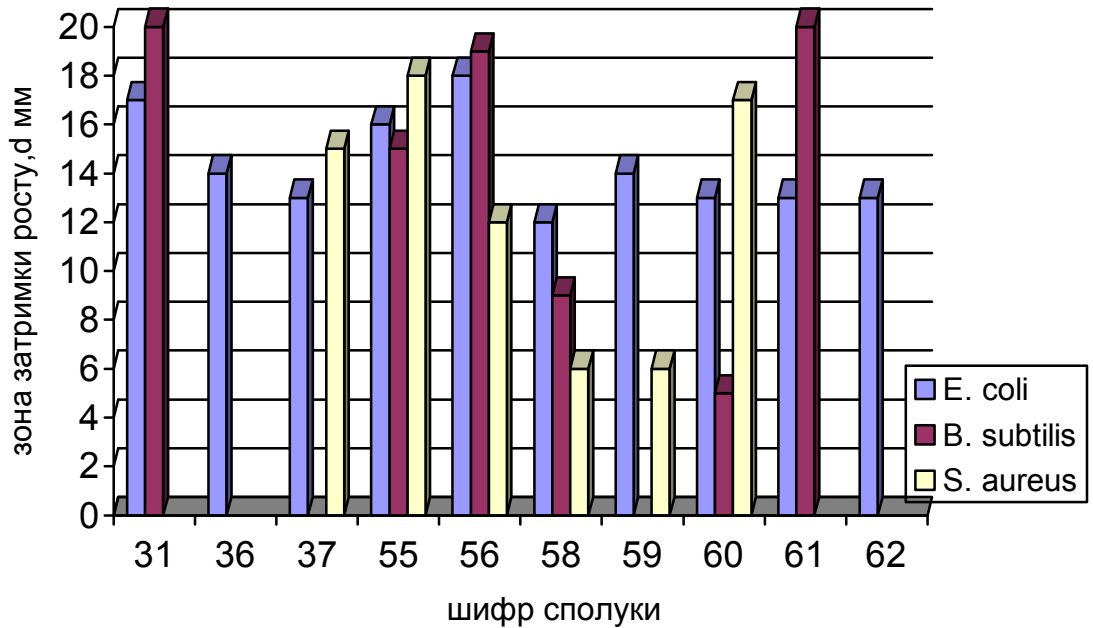
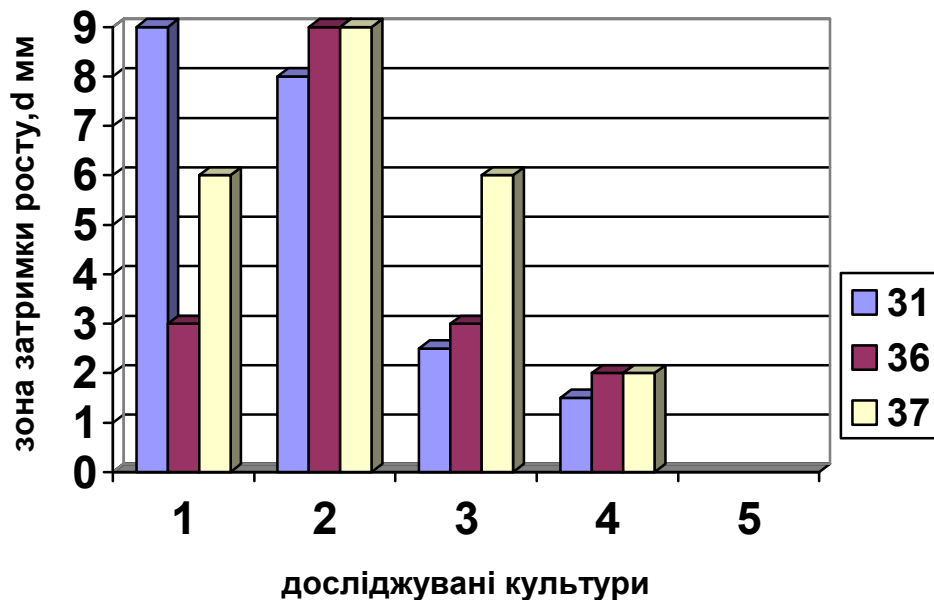


Рис.Протимікробна дія досліджуваних сполук на бактерії



1- *Saccharomyces cerevisiae*, 2- *Candida albicans*, 3- *Penicillium chryzogenum*,
4 - *Rhizopus nigricans*, 5 – *Fusarium*.

Рис.2 Протимікробна дія досліджуваних сполук на гриби та дріжджі

За хімічною структурою протимікробні речовини, які показали найвищу активність – це 2-аміно-1-R-1H-3-карбалкоксипіроло-[2,3-b]хіноксаліни (31,37) та 2-аміно-1-R-3-арилсульфоніл-1H-піроло[2,3-b]-хіноксаліни (36).

Речовини мають в своїй будові такі основні частини: гетероциклічну частину, що являє собою фрагмент - [2,3-b]хіноксаліни, α -фенілетильний залишок в першому положенні системи, гідрофобний хвіст(R) в третьому положенні конденсованої системи.

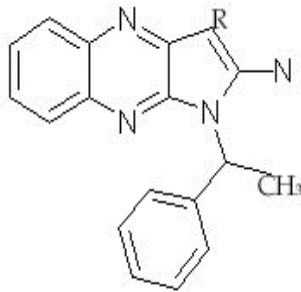


Рис.3 Основна структура речовин – 1-(1-phenylethyl)-2-amine-1H-pyrrolo[2,3-b]quinoxalin.

Можна зробити припущення, що хвіст впливає на проникність (розчинність) речовини в ліпідному шарі мембрани, що і призводить до дезорганізації цитоплазматичної мембрани.

Речовини, які взагалі не проявили ніякої антибіотичної активності в своїй структурі мають більш гідрофільний кінець в третьому положенні. Тобто, в подальшому вивченні речовин будуть відбиратися зразки з найбільш гідрофобним кінцем.

Специфічна токсичність цих сполук обумовлена їхньою взаємодією з одним із компонентів цитоплазматичної мембрани чутливих клітин, що належать до стеринів. У результаті міняється селективність проникності мембран, що приводить до виходу із клітини найважливіших метаболітів і порушенню здатності мембран

контролювати засвоєння живильних речовин. В основі механізму біологічної дії цих сполук лежить порушення ними стану й функціонування мембран клітин у результаті зв'язування речовин з мембранними компонентами. Це викликає, з одного боку, зміну проникності мембран і швидку втрату клітинами життєво важливих з'єднань типу нуклеотидів, неорганічного фосфору, амінокислот, а з іншого боку – пригнічення процесу енергетичного обміну, особливо його початкової стадії – дегідрування .

Висновки

Таким чином, на основі проведеного дослідження встановлено, що сполуки, які проявили максималну протимікробну активність, містять загальний структурний фрагмент 1-(1-фенілетил)-піроло [2,3-в] хіноксаліну. Пошук по доступних базах хімічних сполук з біологічною активністю (MDL) для такого фрагменту не дав результату, тобто антибактеріальна і фунгіцидна активність таких сполук не була раніше описана. Отже, з літературних даних та результатів наших досліджень випливає, що для прояву антибактеріальної та фунгіцидної активності важлива наявність N – (1-фенетил) пірольного угруповання у структурі синтезованих хімічних сполук.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Поройков В.В., Филимонов Д.А.* Компьютерный прогноз биологической активности химических соединений как основа для поиска и оптимизации базовых структур новых лекарств. В сб.: Азотистые гетероциклы и алкалоиды. М.: Иридиум-пресс. – 2001. – Т.1. – С.123-129.
2. *Сазыкин Ю.О.* Антибиотики как ингибиторы биохимических процессов. – М: Наука, 1968. – 447 с.

3. *Сидоренко С.В. Тишков И.В.* Молекулярные основы резистентности к антибиотикам// *Успехи биологической химии.* М: Т. 44. – 2004. – С. 263–363.

4. *Яковлев С. В.* Клиническая химиотерапия бактериальных инфекций. М.: Ньюдиамед. – 1996. – 120с.

5. *Poroikov V.V., Filimonov D.A., Borodina Yu.V., Lagunin A.A., Kos A.* Robustness of biological activity spectra predicting by computer program PASS for non-congeneric sets of chemical compounds.// *Chem. Inform. Comput. Sci.* – 2000. – 40 (6). – P. 1349–1355.

Надійшла до редколегії 18 вересня 2008 року